

Olfactory tubercle kolinergiset neuronit ruokahalun säätelyssä ja huume-ehdollistumisessa

Aurora Laine

Lääketieteen kandidaatti

Medicum

Helsinki 17.12.2018

Tutkielma

aurora.laine@helsinki.fi

Ohjaaja: Teemu Aitta-aho

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääkietieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Medicum	
Tekijä – Författare – Author Aurora Laine			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Olfactory tuberclen kolinergiset neuronit ruokahalun säätelyssä ja huume-ehdollistumisessa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum – Month and year 17.12.2018	Sivumäärä – Sidoantal - Number of pages 31	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Striatumin osuutta ruokahalun säätelyn ja huumeiden käytön neurobiologiassa on tutkittu paljon, mutta striatumien pohjalla sijaitseva olfactory tubercle on jäänyt vähemmälle huomiolle. Myös asetyylikoliinijärjestelmän merkitystä ruokahalun säätelyssä on selvitetty aikaisemmin. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on yhdistää edellä mainitut asiat ja selvittää olfactory tuberclen kolinergisten neuronien merkitystä ruokahalun säätelyssä ja huume-ehdollistumisessa.</p> <p>Tutkimuksessa vietiin virusvektoreilla DREADD-reseptoreja geneettisesti manipuloitujen hiirten aivojen olfactory tubercleihin. Reseptorit ohjautuivat kolinergisiin neuroneihin ja mahdollistavat neuroneiden toiminnan aktivoinnin tai hiljentämisen CNO-lääkeaineen avulla. Reseptoreiden ohjaututtua hiirille tehtiin ruokahalun säätelyn kokeet ja huumemuistikoe. Ruokahalun säätelyn kokeissa mitattiin hiirten ruoankulutusta ilman paastojaksoa ja paastojakson jälkeen. Huumemuistikokeessa mitattiin hiirten liikkeitä ehdollistettu paikkahakuisuus -menetelmää käyttäen. Ehdottomana ärsykkeenä toimi morfiini ja ehdollisena ärsykkeenä kokeessa käytettyjen laatikoiden lattiamateriaali. Kokeiden jälkeen hiirten aivot leikattiin ja värjättiin, jotta reseptorien ilmentymistä olfactory tubercleissa voitiin tutkia mikroskooppilla.</p> <p>Ruokahalun säätelyn kokeista saatujen tulosten perusteella olfactory tuberclessa sijaitsevat kolinergiset hermosolut eivät vaikuta ruoan kulutukseen. Huumemuistikokeen tulosten perusteella olfactory tuberclessa sijaitsevat kolinergiset hermosolut eivät vaikuta morfiinin liikeaktiivisuuteen eivätkä morfiinille herkistymiseen. Tulokset saattavat viitata ruokahalua tai huume-ehdollistumista säätelevien neuronien sijaitsevan kokonaan muualla kuin OT:ssä. Vaihtoehtoisesti OT:ssa voi olla johonkin muuhun kuin kolinergiseen järjestelmään kuuluvia ruokahalua tai huume-ehdollistumista sääteleviä neuroneita. Aineiston pienen koon takia tulokset ovat kuitenkin vain suuntaa antavia. Tulosten vahvistamiseksi aihetta on tutkittava lisää.</p> <p>(199 sanaa)</p>			

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

Olfactory Tubercle; Cholinergic Neurons; Reward; Drug Addiction; Appetite

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

HELDA

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

Sisällys

1 Johdanto.....	1
2 Kirjallisuuskatsaus	2
2.1 Olfactory tubercle	2
2.2 Asetyylikoliini	4
2.3 Ruoan ja huumeiden palkkion säätely	6
2.3.1 Syömisen säätely aivoissa	6
3 Aineisto ja menetelmät	10
3.1 Tutkimusaineisto	10
3.2 Tutkimusmenetelmät	10
4 Tulokset	21
4.1 Ruokahalun säätelyn kokeet	21
4.1.1 Ilman paastojaksoa tehdyt kokeet	21
4.1.2 Paastojakson jälkeen tehdyt kokeet	22
4.2 Huumemuistikoe	23
5 Pohdinta	26
Lähdeluettelo	29

1 Johdanto

Striatumin merkitystä ruokahalun säätelyssä ja huumeiden käytössä on tutkittu paljon (1-3). Tiedetään, että striatumin nucleus accumbens -osa osallistuu ruokahalun ja huumeiden käytön säätelyyn kolinergisten välineuronien välityksellä (4,5). Aikaisempi tutkimus ei ole kuitenkaan juuri yltänyt striatumin ventraaliosassa sijaitsevaan olfactory tubercleen, vaikka sieltä löytyy samankaltaisia prosesseja kuin muualta striatumista (6,7).

Tämän tutkielman tavoitteena on selvittää olfactory tubercleen asetyylikoliinijärjestelmän tehtävää ruokahalun säätelyssä. Laajempaan tavoitteena tällä työllä osana muita tutkimuksia on löytää uusia hermoverkkoja, jotka osallistuvat syömiskäyttäytymisen säätelyyn. Ruokahalun säätelymekanismien tunteminen on tärkeää erityisesti lihavuuden tutkimisessa ja siitä aiheutuvien ongelmien ratkaisussa.

Lisäksi tutkielmassa selvitetään, osallistuuko olfactory tubercleen asetyylikoliinijärjestelmä huumeiden käyttöön liittyvän palkkion säätelyyn. Huumeisiin liittyvän palkkiovaikutuksen ja laajemmin huumeiden vaikutusmekanismien tunteminen on olennaista psykiatristen häiriöiden, kuten addiktion ja mielialahäiriöiden ymmärtämisessä ja hoidossa.

Toinen luku käsittelee olfactory tuberclea, asetyylikoliinijärjestelmää, syömisen säätelyä sekä ruokaan ja huumeisiin liittyvää palkkiovaikutusta aiemmin tehtyjen tutkimusten pohjalta. Kolmannessa luvussa kuvataan tutkimuksessa käytetty aineisto ja tutkimusmenetelmät. Neljännessä luvussa tarkastellaan tutkimuksen tuloksia havainnollistavien kuvien avulla, ja viidennessä luvussa pohditaan saatujen tulosten merkitystä.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Olfactory tubercle

Olfactory tubercle (OT) on striatumin ventraaliosassa sijaitseva etuaivoihin kuuluva rakenne, joka osallistuu hajujen ja muiden aistien käsittelyyn sekä motivoituneen käyttäytymisen säätelyyn. OT saa monosynaptisen viestinvälityksen hajukäämiltä (olfactory bulb) ja on siten osa sensorista aivokuorta. (8,9)

OT sijaitsee nucleus accumbensin ja ventral pallidumin ventraalipuolella aivojen keskiviivan ja piriformisen aivokuoren välissä (8). Muista sensorisen aivokuoren rakenteista poiketen OT koostuu poimuttuneista, dynaamisista lamelleista (lamina). Lamellit muodostavat kolme kerrosta: pinnallisimpana on molekulaarinen kerros, keskimmäisenä tiivis solukerros ja syvimpänä monimuotoinen solukerros. Kaikissa kerroksissa yleisin solutyyppi on GABAerginen keskikokoinen haarakkeinen neuroni, joiden lisäksi OT:ssa on muun muassa piasoluja (pial cell) ja sirppisoluja (crescent cell). (8,10) Erityistä OT:lle ovat jyvässoluista (granule cell) koostuvat tiheät islands of Calleja -solurykelmät, jotka ovat jakautuneet OT:ssa laajalle alueelle (8,11,12). OT:n lateraaliosissa voidaan lisäksi erottaa tiiviisti pakkautuneista keskikokoisista haarakkeisista neuroneista koostuvia alueita (12).

Olfactory tuberclessa on toisistaan erillään olevia alueita (domain), jotka liittyvät erilaisiin motivoituneisiin ja hedonisiin käyttäytymisiin (11). OT on yhteydessä lukuisiin eri aivoalueisiin, erityisesti palkkio- ja sensorisiin keskuksiin (9). Viestinvälityksen se saa suurimmaksi osaksi hajukäämistä tulevilta projektioneuroneilta glutamatergisten synapsien välityksellä. Lisäksi OT:een tulee runsaasti assosiaationeuroneita hajuaivokuorelta, amygdalasta ja prefrontaalikuorelta sekä dopaminergisiä hermoyhteyksiä ventraaliselta tegmentaali-alueelta (VTA). (8,12) OT:sta lähtevät neuronit puolestaan hermottavat pääasiassa ventraalista pallidumia.

Hermoyhteyksiensä ansiosta OT on keskeisessä asemassa muutettaessa sensorista informaatiota tavoitteelliseksi toiminnaksi. (8) OT:n sijainti on ihanteellinen myös useiden erilaisten tietojen yhdistämisen kannalta (11).

Olfactory tubercle kuuluu toisaalta hajuaisti- ja toisaalta palkkiojärjestelmään (13). Olfactory tubercleen liittyvä tutkimus on käsitellyt lähinnä OT:n suhdetta palkkiojärjestelmään (9). OT:n on havaittu välittävän muun muassa kokaiinin aikaansaamaa palkkiota (14). Osa OT:n neuroneista koodittaa palkkiota sen voimakkuuden, osa palkkion tyypin mukaan (6).

Olfactory tuberclen sensoriset tehtävät ovat jääneet melko vähälle huomiolle (9). Hiirillä OT:n neuronien laukomisnopeuden on todettu koodittavan hajujen valenssia (13). Toisaalta hiirillä OT:n eri alueiden on havaittu edustavan erilaisia hajujen aiheuttamia käyttäytymisiä (12). Olfactory tubercle saattaa olla tärkeä myös hajuaistitiedon lähteen määrittämisessä. OT:n hajuaistiin ja palkkioon liittyvän toiminnan välinen yhteys on vielä epäselvä. (9) Hajujen ohella OT voi osallistua kuuloaistiin liittyvien viestien käsittelyyn haju- ja kuuloaistiin liittyvän viestinvälityksien yhdistymisen kautta (15). OT osallistuu myös aistitiedon multimodaaliseen käsittelyyn (9).

2.1.1 OT ja nucleus accumbens

OT:lla ja sen dorsaalipuolella sijaitsevalla nucleus accumbensilla tiedetään olevan runsaasti morfologisia ja kemiallisia yhtäläisyyksiä (6,7). Hermoyhteyksien ja solujen samankaltaisuuksien pohjalta on tutkittu myös OT:n ja NAc:n toiminnan yhtäläisyyksiä. Nucleus accumbensin tiedetään osallistuvan tavoitteellisiin toimintoihin, ja myös olfactory tuberclesta on löydetty vastaavia prosesseja. (6) Erityisesti mediaalisella NAc:lla ja mediaalisella OT:lla on havaittu toiminnallisia yhtäläisyyksiä. Toisaalta mediaalisella ja lateraalilla OT:lla on havaittu toiminnallisia eroavaisuuksia, ja mediaalisen OT:n katsotaankin muistuttavan enemmän mediaalista NAc:a kuin

lateraalista OT:a. (16) NAC:n ja OT:n hermoyhteyksien erot saattavat viitata erilaisiin rooleihin motivoituneessa käyttäytymisessä (6).

2.2 Asetyylikoliini

Asetyylikoliini on hermo-lihasliitoksissa, autonomisissa ganglioissa ja aivoissa esiintyvä hermovälittäjäaine (17). Asetyylikoliinia synaptisena välittäjäaineenaan käyttäviä neuroneita kutsutaan kolinergisiksi neuroneiksi (18). Aivojen asetyylikoliinijärjestelmä muodostuu kahdeksasta kolinergisestä soluryhmästä (Ch1-Ch8), jotka ovat yhteydessä muihin keskushermoston rakenteisiin (19).

Asetyylikoliini syntetisoidaan kolinergisissä neuroneissa asetyylikoentsyymi-A:sta ja koliinista, jolloin muodostuu asetyylikoliinia ja koentsyymi-A:ta. Reaktiota katalysoi koliiniasetyyylitransferaasi (ChAT). Myös karnitiiniasetyyylitransferaasi pystyy tuottamaan asetyylikoliinia, mutta sen merkitys aivoissa näyttäisi olevan vähäinen. ChAT syntetisoidaan hermosolun soomassa ja kuljetetaan hitaan aksonaalisen kuljetuksen avulla hermosolun ulokkeisiin. ChAT:a on löydetty kaikkialta kolinergisistä neuroneista, joten ACh:a voidaan tuottaa kaikissa neuronin osissa. Pääosa synteesistä tapahtuu kuitenkin presynaptisten hermopäätteiden sytoplasmassa lähellä asetyylikoliinin vapautumispaikkaa. Asetyylikoliinin asetyyyliryhmät ovat peräisin glukoosista ja pyruvaatista. Pyruvaatista saatu asetyyli-KoA tuotetaan pyruvaattidehydrogenaasikompleksin avulla mitokondrioissa, joista se siirretään sytoplasmaan. Koliinia on vapaana veriplasmassa, josta se siirtyy aivojen solunulkoiseen nesteeseen ja lopulta hermopäätteeseen. (18)

Synteesin jälkeen osa ACh:sta kuljetetaan sytoplasmasta synaptisiin vesikkeleihin ATPaasin avulla. ACh:a vapautuu hermopäätteistä sekä spontaanisti että hermoimpulssien stimuloimana. (18) Aivoissa asetyylikoliinin tärkeimmät lähteet ovat distaalisia alueita hermottavat projektioneuronit ja paikalliset välineuronit (17).

Asetyylikoliinin vaikutukset välittyvät asetyylikoliinireseptorin (AChR) kautta. Asetyylikoliinireseptoreja on kahta päätyyppiä: ionotrooppinen nikotiinireseptori (nAChR) ja metabotrooppinen muskariinireseptori (mAChR). Molempia reseptoreja on ympäri kehoa sekä hermosoluissa että muissa soluissa, mutta tässä tutkielmassa keskitytään neuronalsiin asetyylikoliinireseptoreihin. (20,21)

Asetyylikoliinin neuronalsinen nikotiinireseptori on ligandikytketty ionikanava. Se muodostuu viidestä alayksiköstä, jotka ympäröivät veden täyttämää aukkoa. Erilaiset alayksikköjen yhdistelmät muodostavat useita rakenteeltaan ja toiminnaltaan erilaisia reseptorialatyyppejä. Kaikilla alatyypeillä on kuitenkin yhteinen toimintaperiaate: asetyylikoliinin tai muun agonistin sitoutuminen reseptoriin saa aikaan ionikanavan avautumisen, jolloin kationit pääsevät virtaamaan kanavan läpi. (22) Kokonaisuudessaan nikotiinireseptorien aktivaatio tapahtuu mikrosekuntien aikana (21). Asetyylikoliinin lisäksi reseptoriin voi sitoutua esimerkiksi tupakasta saatava nikotiini (22).

Neuronalsiset nikotiinireseptorit voidaan jakaa presynaptisiin ja -terminaalsiin, postsynaptisiin ja ei-synaptisiin. Presynaptiset ja -terminaalsiset reseptorit säätelevät monien neurotransmittereiden vapautumista, postsynaptiset välittävät nopeaa eksitatorista transmissiota ja ei-synaptiset nAChR:t osallistuvat useiden hermovälittäjäainejärjestelmien toiminnan säätelyyn. Suurin osa keskushermoston nikotiinireseptoreista sijaitsee presynaptisesti tai preterminaalisesti. (22)

Asetyylikoliinin muskariinireseptorit ovat G-proteiinikytkettyjä reseptoreita. Ne koostuvat seitsemästä solukalvon läpäisevästä osasta, jotka ulottuvat solun ulkopuolelta sisäpuolelle. Asetyylikoliini sitoutuu reseptorin solunulkoiseen osaan, mikä saa aikaan G-proteiinin aktivoitumisen solun sisäpuolella. Aktivoitunut G-proteiini käynnistää solunsisäisen toisiolähettijärjestelmän. (23) Reseptorit voivat sijaita sekä pre- että postjunktionaalisesti (24). Muskariinireseptorien aktivaatio on hitaampaa kuin nikotiinireseptorien (21).

Muskariinireseptorit jaetaan viiteen alatyyppiin: M1, M2, M3, M4 ja M5. Reseptorialatyypit eroavat toisistaan niin sijaintinsa kuin toimintansa suhteen. Myös

reseptorin aktivoima G-proteiinityyppi vaihtelee reseptorialatyypin mukaan: M2 ja M4 aktivoivat pääasiassa Gi- tai Go-tyypin G-proteiineja ja M1, M3 ja M5 pääasiassa Gq-tyypin G-proteiineja. (23,24)

Asetyylikoliinin vaikutukset riippuvat sen vapautumispaikasta, reseptorialatyypistä ja kohdeneuroneista. Ääreishermostossa ACh toimii eksitatorisena välittäjäaineena, kun taas aivoissa asetyylikoliinin tehtävät liittyvät erityisesti neuronien muokkaukseen. ACh osallistuu neuronien muokkaukseen muuttamalla neuronien ärtyvyyttä, säätelemällä välittäjäaineiden vapautumista ja koordinoimalla neuroniryhmien aktivointia ja siten säätelemällä neuronien vastetta ulkoisiin ja sisäisiin viesteihin. Kolinerginen muokkaus on keskeisessä asemassa monimutkaisten käyttäytymisten säätelyssä. (17) Tämän tutkielman kannalta keskeisiä ovat asetyylikoliinin ruokahalun säätelyyn ja huumeiden käyttöön liittyvät tehtävät. Asetyylikoliinitasojen nousu nucleus accumbensissa edistää kylläisyyttä. NAc:n asetyylikoliinipitoisuus on koholla myös liiallisen maukkaan ruoan syömisen tai huumeiden käytön aikaansaamassa vieroitusoireiden välttämiskäyttäytymisessä. Dorsaalisen striatumin kolinergisten välineuroneiden tiedetään säätelevän huumeiden käyttöä ja huumeaddiktion kehittymistä. (5)

2.3 Ruoan ja huumeiden palkkion säätely

Palkkiolla tarkoitetaan asiaa, joka vahvistaa käyttäytymistä (25). Lähes mikä tahansa ärsyke, kuten auringonotto, tatuoinnit, uhkapelit, ruoka tai huumeet, voi aikaansaada palkkiovaikutuksen (26). Palkkiovaikutuksen keskeisenä välittäjänä toimii dopamiini (27). Palkkiovaikutus mahdollistaa addiktion muodostumisen (26). Huumeiden aikaansaama palkkiovaikutus on pääasiallinen syy niiden käytölle huumeaddiktion ensivaiheessa (28).

2.3.1 Syömisen säätely aivoissa

Syömisen ja energian kulutuksen säätely tapahtuu pääasiassa keskushermoston välityksellä. Ruokaan liittyvien viestien tunnistus tapahtuu sensorisissa elimissä. Viestit

siirtyvät kortikolimbiseen palkkiojärjestelmään, jonka keskeisiä rakenteita ovat erityisesti VTA ja NAc. Kortikolimbisessä palkkiojärjestelmässä tapahtuu ruokaan liittyvien hedonisten ja kannustinominaisuuksien käsittely. Nämä ominaisuudet edistävät syömistä ennakoivia toimenpiteitä ja syömisen aloitusta. (29)

Syömistä estävänä mekanismina toimii kylläisyys (30). Kylläisyys on kumulatiivinen prosessi, jossa pyrkimys syödä laskee vähitellen aterian aikana: ruoan nieleminen saa aikaan inhibitorisia signaaleja, jotka kehittyvät progressiivisesti ja lopulta päättävät syömisen (4,30,31). Näihin inhibitorisiin signaaleihin kuuluu niin sensorisia, kognitiivisia, gastrisia, hormonaalisia kuin hermostollisia tekijöitä. Kylläisyyden tehtävänä on myös estää syömistä ennen seuraavaa ateriaa. (30,31)

Pitkän aikavälin energiatasapainon ja kehon painon säätelyssä keskeisessä asemassa on hypotalamus. Hypotalamuksen hermoverkot säätelevät syömistä muun muassa muokkaamalla taka-aivojen herkkyyttä lyhyen aikavälin kylläisyshormoneille, joten aivoissa tapahtuva syömisen säätely on yhteydessä hormonien välityksellä tapahtuvaan säätelyyn. Hypotalamuksen lisäksi syömisen homeostaattiseen säätelyyn osallistuu useita oreksigeenisia ja anoreksigeenisia neuroneita. (29)

Ruokahalun säätelyn toimiessa tehokkaasti kylläisyys ja nälkä seuraavat toisiaan niin, että energian saanti ja tarve pysyvät tasapainossa (30). Energiatasapainon säätelyn ollessa homeostaattista syöminen tapahtuu aineenvaihdunnan ohjaamana (32). Ruoan hedoniset ominaisuudet voivat kuitenkin stimuloida syömistä myös energiantarpeen ollessa on täytetty (26,33,34). Hedonismin ohjaama syöminen edistää painon nousua ja lihavuutta (26,34). Ääritapauksissa syöminen voi muistuttaa addiktiokäyttäytymistä (32). Myös häiriöt niin hormonien välityksellä tapahtuvassa signaloinnissa kuin hypotalamuksen ja taka-aivojen toiminnassa saattavat myötävaikuttaa energiaepätasapainon ja lihavuuden kehittymisessä (29).

2.3.2 Ruokapalkkio

Ruokapalkkiolla tarkoitetaan ruoan arvoa yksilölle syömisen hetkellä. Palkkiovaikutuksen määräävät nälkä sekä ruoan maittavuus: syöminen on palkitsevampaa, kun syöjä on nälkäinen ja kun ruoka on hyvänmakuista. (35) Palkkiovaikutus liittyy erityisesti runsaasti sokereita ja rasvaa sisältäviin ruokiin (27). Ruoan palkkiovaikutus vaikuttaa syödyn ruoan määrään (35). Palkkioon liittyvät signaalit voivat ohittaa homeostaattiset kylläisyssignaalit ja johtaa siten ylensyöntiin ja painon nousuun (26). Nautittu ruokamäärä riippuu kuitenkin myös muista tekijöistä, kuten ruoan saatavuudesta ja ruokavalioon liittyvistä rajoitteista (35).

2.3.3 Huumepalkkio ja huumeaddiktio

Huumeiden käyttöön liittyvän palkkion välityksessä keskeisessä asemassa ovat ventraaliselta tegmentaalialueelta ventraaliseen striatumiin, erityisesti nucleus accumbensiin, aksoneita lähettävät dopamiinineuronit (25,27,28,36). Kokemus huumeen palkitsevuudesta on yhdistetty erityisesti ventraalisessa striatumissa tapahtuvaan dopamiinin vapautumiseen, mutta palkkioon osallistuu myös muita dopamiinireittejä (27,28). Vaikutuksen voimakkuus ja dopamiinin lisääntymisen mekanismi vaihtelevat huumetyyppien välillä. Dopamiinin lisäksi myös muut neurotransmitterit, kuten kannabinoidit ja opioidit, osallistuvat huumeen palkkiovaikutukseen. (28)

Huumeen toistuva käyttö voi johtaa addiktioon (37). Addiktioon liittyy pakonomainen huumeiden etsiminen ja ottaminen sekä korkea uusiutumistaipumus (38). Addiktiossa kyky säännellä pakonomaista halua käyttää huumeita on heikentynyt huolimatta kielteisistä seurauksista (37). Addiktion kehittymisnopeus riippuu useista tekijöistä, kuten huumetyypistä ja altistustavasta. Kontrolloidun huumeiden käytön muuttuessa pakonomaiseksi nucleus accumbensin merkitys vähenee ja dorsaalisen striatumin merkitys lisääntyy. (36) Addiktio vaikuttaa palkkiojärjestelmän lisäksi useisiin muihin järjestelmiin, kuten muistiin, motivaatioon ja mielialaan liittyviin hermoverkostoihin (27). Huumeaddiktiossa motivaatio huumeita kohtaan kasvaa ja muita palkkiotyyppejä

kohtaan vähenee (27,36). Dopamiinin merkitys ei ole addiktiossa yhtä selkeä kuin palkkiovaikutuksessa (27).

2.3.4 Yhteys ruokapalkkion ja huumeaddiktion välillä

Sekä huumeaddiktiossa että lihavuudessa tietty palkkiotyyppi muuttuu tärkeämmäksi kuin muut: huumeaddiktiossa tämä palkkiotyyppi on huume ja lihavuudessa ruoka. Samalla muiden palkkiotyyppien merkitys huumeaddiktille tai lihavalle henkilölle vähenee. Sekä huumeet että ruoka saavat aikaan voimakkaan vahvistumisvaikutuksen, joka voi tietyissä olosuhteissa tai alttiilla henkilöllä peittää alleen homeostaattiset säätelymekanismit. (27,39) Huumeiden hedoniset ominaisuudet johtavat addiktioon ja ruoan hedoniset ominaisuudet painon nousuun (34).

Sekä ruoan liiallisessa kulutuksessa että pakonomaisessa huumeiden käytössä keskeisiä ovat aivojen dopamiinireitit, jotka säätelevät käyttäytymisvastetta ympäristön ärsykkeisiin (39). Maukkaan ruoan syömisen on myös havaittu aikaansaavan samankaltaisia dopamiinijärjestelmän plastisuuden muutoksia kuin huumeiden käytön. Plastisuuden muutokset liittyvät toleranssin kehittymiseen. Huumeiden käytön lopettamisen vaikeuksiin on yhdistetty palkkioon ja tarkkaavaisuuteen liittyvien aivoalueiden ylireagointi huumevihjeisiin, ja vastaavaa aktivaatiota on havaittu lihavilla henkilöillä ruokavihjeiden yhteydessä. (26)

Pakonomaisella syömisellä ja huumeaddiktiolla on kuitenkin myös eroavaisuuksia. Mesolimbisten dopamiiniverkostojen merkitys syömisessä ei ole yhtä yksiselitteinen kuin sen merkitys huumeaddiktiossa. (33) Huumeet pidentävät keinotekoisesti dopamiiniviestintää, mutta maukkaan ruoan syömisellä ei ole samanlaista vaikutusta (26). Myös hypothalamuksen kautta tapahtuva säätely eroaa huumeiden ja ruoan nauttimisen välillä: huumeiden nauttimiseen vaaditaan VTA:sta NAc:iin tapahtuvan dopamiinisignaaloinnin aktivaatio, kun taas syömisen käynnistämiseen riittää hypothalamuksen stimulaatio ilman dopamiinijärjestelmän aktivaatiota. Huumeaddiktiota ja pakonomaista syömistä vertailtaessa tulee myös ottaa huomioon,

että huumeaddiktio on tautitila, kun taas syömisessä kyse on fysiologisesta vasteesta, joka voi myöhemmin kehittyä somaattiseksi sairaudeksi. (33)

3 Aineisto ja menetelmät

3.1 Tutkimusaineisto

Tutkimus toteutettiin käyttämällä koe-eläiminä koliini-asetyyylitransferaasi-cregeenimanipuloituja hiiriä. Hiiriä oli yhteensä 20, joista puolet olivat naaraita ja puolet uroksia. Hiiriä pidettiin 12 tunnin pimeä-valo-rytmissä, jossa valot syttyivät kello 20.00 ja sammuiivat kello 8.00. Hiiret olivat 1-6 yksilön häkeissä, jotka olivat yksilöllisesti ilmastoituja. Häkit olivat eläinkoetilojen huoneessa, jossa ilman suhteellinen kosteus oli 50 % ja lämpötila noin 20 °C. Hiiret saivat syödä niille annettua ruokaa (Maintenance Diet for Rats/Mice 1324, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Saksa) ja juoda vesijohtovettä rajoittamattomasti.

3.2 Tutkimusmenetelmät

Hiirten olfactory tubercleiden toimintaa selvitettiin kahden erilaisen kokeen avulla. Ennen kokeita hiirten olfactory tubercleihin vietiin neurokirurgian avulla DREADD-reseptoreja myöhempää analyysiä varten. Reseptorien ohjaututtua kolinergisiin neuroneihin tehtiin ensin ruokahalun säätelyn kokeet, joissa mitattiin hiirten ruoankulutusta ilman paastojaksoa ja paastojakson jälkeen. Toinen koe oli ehdollistettuun paikkahakuisuuteen perustuva huumemuistikoe, jossa mitattiin hiirten liikkeitä. Kokeiden jälkeen hiirten aivot leikattiin ja värjättiin, jotta reseptorien ilmentyminen voitiin nähdä niiden olfactory tubercleissa.

3.2.1 DREADD

DREADD-reseptorit (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) ovat kemogeneettisiä työkaluja, joita käytetään neuronien toiminnan aktivoimiseen ja hiljentämiseen. Ne toimivat endogeenisten G-proteiinikytkettyjen reseptorien korvaajina, joten niiden aikaansaamat signaalireitit vastaavat solussa *in vivo* tapahtuvia signaalireittejä. (40) Niiden avulla voidaan tutkia muun muassa käyttäytymiseen, emootioihin ja motorisiin toimintoihin liittyviä solujen signaaleja ja hermoverkkoja (41). DREADD-reseptorien etuja ovat solutyypispesifisyys ja ei-invasiivisuus (40). DREADD-teknologialla voidaan esimerkiksi selvittää, miten yksittäinen solutyyppi osallistuu addiktiokäyttäytymiseen (38). Tätä tietoa voidaan hyödyntää muun muassa lääkkeiden kehittämisessä (42).

DREADD-reseptorit voidaan jaotella Gq-, Gi-, Gs- ja β -arrestiini-DREADDeihin niiden aktivoiman signaalikaskadin mukaan (40). Gq-DREADDeja on kolme tyyppiä, hM1Dq, hM3Dq ja hM5Dq, joista ihmisen M3-muskariinireseptoriin perustuva hM3Dq on tavallisin. Gq-DREADDit aktivoidaan klotsapiini-N-oksidilla (CNO), klotsapiinin farmakologisesti inertillä metaboliitilla. Myös Gi-DREADDeja on kolme tyyppiä: hM2Di, hM4Di ja KORD. Näistä yleisimmin käytetty on hM4Di. hM2Di ja hM4Di voidaan aktivoida CNO:lla kuten Gq-DREADDit. KORDin ligandina käytetään salvinoriini B:tä. (41) Gs-DREADD kytkeytyy sekä Gs- että Golf-proteiineihin (40). Gq- ja Gi-DREADDeista poiketen Gs-DREADD on lievästi aktiivinen myös ilman ligandia. Myös Gs- ja β -arrestiini-DREADDien aktivoimiseen käytetään CNO:a. (41)

Tutkimuksessa DREADD-reseptorit vietiin geneettisesti manipuloitujen hiirten olfactory tubercleihin neurokirurgian avulla. Reseptorit ohjattiin olfactory tuberclen kolinergisiin neuroneihin virusvektoreiden avulla. Virusvektorina toimi AAV (adeno-associated virus). DREADD-reseptorien inkubaatioaika oli kaksi viikkoa. Inkubaatioajan loppupuolella aloitettiin hiirten totuttaminen ihmisen läheisyyteen ja käsittelyyn.

Hiiret jaettiin kokeita varten kolmeen ryhmään niihin transduktoidun reseptorigeenin mukaan: hM3Dq-reseptorigeenillä ja m-Cherry-väriaineella transduktoitu hiiriryhmä (hM3Dq-ryhmä), hM4Di-reseptorigeeneillä ja m-Cherry-väriaineella transduktoitu hiiriryhmä (hM4Di-ryhmä) sekä pelkällä m-Cherry-väriaineella transduktoitu hiiriryhmä (mc-ryhmä). Mc-ryhmä toimi kontrolliryhmänä.

3.2.2 Ruokahalun säätelyn kokeet

Ruokahalun säätelyn kokeissa mitattiin hiirten ruoankulutusta yhteensä kymmenenä päivänä. Kokeissa käytettiin lääkeaineena CNO:a, kantoliuoksena DMSO:n ja salinin seosta sekä kontrolliliuoksena salinia. Aluksi suoritettiin ruoankulutuksen lähtötasomittaukset, joissa hiirille annettiin kontrolliliuosta. Tämän jälkeen ruoankulutusta mitattiin antaen joko CNO-liuosta tai kantoliuosta sekä ilman paastoa että paastojakson jälkeen. Kaikki ruoankulutuksen mittaukset aloitettiin kello 8, jolloin hiirten valorytmin pimeävaihe alkoi. Pimeässä tehtyjen mittausten helpottamiseksi käytettiin punaista valoa tuottavaa pöytälamppua.

Ennen kokeiden alkamista hiiret totutettiin ihmisen läheisyyteen ja käsittelyyn yhteensä viiden päivän pituisen totuttamisjakson aikana. Ensimmäisenä päivänä laitettiin käsi hetkeksi jokaiseen häkkiin ensin aamulla ja uudestaan iltapäivällä. Toisen päivän aamuna hiiret nostettiin hännän proksimaalipäästä yksi kerrallaan kädelle ja laitettiin toiseen häkkiin. Kun kaikki saman häkin hiiret olivat toisessa häkissä, ne nostettiin yksitellen takaisin kotihäkkiinsä. Näin varmistettiin, että jokainen yksilö käsitellään kerran. Toisen totuttamispäivän iltapäivällä hiiret nostettiin vielä yksitellen hännän proksimaalipäästä hetkeksi toisen häkin päälle, josta ne nostettiin toiseen häkkiin ja lopulta takaisin kotihäkkiin kuten aamulla. Kolmantena, neljäntenä ja viidentenä päivänä hiirille annettiin saliini-injektio (0,1 ml/10 g) vatsaonteloon. Ennen injektioiden antamista hiirille tehtiin tussilla häntämerkit, jotta yksilöt olisi helpompi erottaa toisistaan. Merkintöjä vahvistettiin säännöllisesti koko koejakson ajan.

Ruoan kulutuksen kokeet aloitettiin mittaamalla ruoankulutus lähtötasolla ilman CNO:n antamista. Tätä varten hiiret jaettiin satunnaisesti kahteen ryhmään ($n = 10$ ja $n = 10$), joissa molemmissa oli sekä uros- että naarashiiriä. Lähtötasotesti suoritettiin kahtena päivänä, eri ryhmille eri päivinä. Mittausten ajaksi hiiret laitettiin yksilöhäkkeihin, jotka merkittiin hiirten kotihäkin ja häntämerkin mukaan. Kuhunkin häkkiin punnittiin noin 100 g hiirten normaalisti syömää ruokaa, ja tarkka määrä kirjattiin ylös. Kokeessa käytettiin 0,01 g:n tarkkuudella punnitsevaa vaakaa. Noin puoli tuntia ennen ruoankulutuksen mittauksen aloitusta hiiret saivat 0,1 ml/10 g saliinia vatsaonteloon 27 G -koon injektioneulalla. Mittaukset suoritettiin punnitsemalla häkkien ruoat manuaalisesti tunnin välein kello 8-12. Lopuksi hiiret siirrettiin takaisin kotihäkkeihinsä.

Lähtötasotestin jälkeen ruoankulutuksen mittaukset toistettiin antamalla hiirille vehikkeliliuosta tai CNO:a yhteensä neljänä päivänä. Hiiret jaettiin kokeita varten kahteen ryhmään ($n = 10$ ja $n = 10$), ja kokeet suoritettiin annettavaa injektiota lukuun ottamatta kuten lähtötasotesti. Toinen ryhmistä sai vehikkeliliuosta ja toinen CNO:a, minkä jälkeen mittaukset toistettiin antamalla CNO:a saaneelle ryhmälle vehikkeliliuosta ja vehikkeliliuosta saaneelle ryhmälle vastaavasti CNO:a. Näin jokainen hiiri sai kerran vehikkeliliuosta ja kerran CNO-liuosta.

Vehikkeliliuos (0,1 ml/10 g) tai CNO-liuos (0,1 mg/ml; 0,1 ml/10 g) valmistettiin kunkin koepäivän aamuna ennen mittausten alkamista. Molempien liuosten valmistus aloitettiin lämmittämällä pakkasesta otettua saliinia (0,9 %) muutaman sekunnin ajan. Vehikkeliliuos valmistettiin sekoittamalla saliini ja DMSO keskenään. CNO-liuosta varten CNO punnittiin analyysivaa'alla. Tarkka massa kirjattiin ylös liuoksen tilavuuden laskemista varten. Punnittu CNO liuotettiin ensin DMSO:iin, ja DMSO:n avulla saliiniin. DMSO:n osuus valmistetun liuoksen kokonaistilavuudesta oli molemmissa liuoksissa 0,5 %. Vehikkeliliuos tai CNO-liuos injektioitiin hiirille i.p. noin puoli tuntia ennen mittausten alkamista (injektioneulan koko 27 G).

Lopuksi mitattiin hiirten ruoankulutus paastokokeissa. Ennen varsinaista paastokoetta hiiret totutettiin paastoon ottamalla niiltä ruoka pois 14 tunnin ajaksi kello 18 alkaen. Paastoon totutuksen jälkeen pidettiin yhden vuorokauden tauko ennen varsinaisia paastokokeita, jotta hiiret ehtivät palautua paastosta. Varsinaisia paastokokeita tehtiin neljä kappaletta, joita varten hiiret jaettiin satunnaisesti kahteen ryhmään ($n = 10$ ja $n = 10$). Paastoaika oli varsinaisissa kokeissa 24 tuntia. Ruoka otettiin hiiriltä pois ruoankulutuksen mittauksia edeltävän päivän aamuna kello 8 ja annettiin takaisin mittausaamuna kello 8. Kumpikin hiiriryhmä sai kerran CNO-liuosinjektion ja kerran vehikkeliliuosinjektion, ja kokeet suoritettiin paastoa lukuun ottamatta kuten aikaisemmat ruokahalun säätelyn kokeet. Paaston vaikutuksen tarkistamiseksi hiiret punnittiin jokaisen paastojakson alussa ja lopussa.

3.2.3 Huumemuistikoe

Jotkin psykoaktiiviset huumeet/lääkkeet toimivat vahvistajina, jotka lisäävät lääkkeiden käytön jatkumista edistäviä toimintoja, kuten lääkkeiden etsimistä ja ottamista. Tämä saattaa johtaa lääkkeiden väärinkäyttöön ja addiktioon. Lääkkeiden aikaansaama vahvistumista voidaan arvioida laboratorioeläimillä ehdollistettu paikkahakuisuus (conditioned place preference, CPP) -menetelmän avulla. (43) Tätä menetelmää hyödynnettiin myös huumemuistikokeessa.

Ehdollistetussa paikkahakuisuudessa käytetään kahta ärsykettä: ehdotonta ärsykettä (unconditioned stimulus, US) ja alun perin neutraalia, ehdollista ärsykettä (conditioned stimulus, CS). Lääkkeiden vaikutukset toimivat ehdottomana ärsykkeenä, ja ehdollinen ärsyke on jokin ympäristön ärsyke. Ehdoton ärsyke liitetään toistuvasti aiemmin neutraalin ärsykkeen kanssa, jolloin koe-eläin alkaa joko suosia tai karttaa ehdollista ärsykettä riippuen käytetyn ehdottoman ärsykkeen luonteesta. (43) Ehdollistamisen jälkeen paikkahakuisuus testataan antamalla hiiren valita vapaasti ehdollisten ärsykkeiden välillä (44).

Ehdollistetun paikkahakuisuustestin avulla saadaan tietoa käytetyn huumeen palkitsevuudesta. Kyky saada aikaan ehdollistettua paikkahakuisuutta on erilainen eri lääkkeillä. Myös ehdollistumiskertojen määrä vaikuttaa ehdollistetun paikkahakuisuuden voimakkuuteen: yleensä ehdollistettu paikkahakuisuus on sitä voimakkaampaa, mitä enemmän ehdollistumiskertoja tehdään. (43) Tässä tutkimuksessa huumemuistikokeen tarkoituksena oli selvittää olfactory tubercle kolinergisten hermosolujen yhteyttä morfiinin palkitsevuuteen.

Huumemuistikokeessa käytettiin ehdottomana ärsykkeenä morfiinia ja sen psykofarmakologisena kontrollina saliinia. Ehdollisena ärsykkeenä oli kokeessa käytettyjen laatikoiden lattiamateriaali, joita oli kaksi tyyppiä: verkkomainen ja muovinen. Lattiamateriaalit toimivat pääosin kosketukseen perustuvina ärsykkeinä. Hiiret ($n = 20$) jaettiin koetta varten neljän hiiren ryhmiin siten, että jokaisessa ryhmässä oli kaikkia eri DREADD-tyyppejä (hM3Dq, hM4Di ja mc). Ryhmät suunniteltiin niin, että kotihäkki voitaisiin avata vain kerran tai maksimissaan kaksi kertaa yhden koesession aikana, sillä häkin avaaminen häiritsee ehdollistumista. Varsinaisen koeryhmänsä lisäksi jokainen hiiri kuului joko verkko+- tai muovi+-alaryhmään. Verkko+-ryhmän hiiret saivat morfiinin yhdistettynä verkkolattiaan ja saliinin yhdistettynä muovilattiaan, ja muovi+-ryhmän hiiret morfiinin yhdistettynä muovilattiaan ja saliinin yhdistettynä verkkolattiaan. Noin puolet jokaisen DREADD-ryhmän hiiristä kuuluivat verkko+-ryhmään ja puolet muovi+-ryhmään. Kaikki kokeet tehtiin yhdelle ryhmälle kerrallaan. Hiiriä oli alun perin 20, mutta yksi hiiri kuoli kesken kokeiden, joten yhdessä ryhmässä oli loppuissa kokeissa vain kolme hiirtä. Tässä kolmen hiiren ryhmässä oli kuitenkin edelleen kaikkia DREADD-tyyppejä.

Huumemuistikoe suoritettiin kuutena peräkkäisenä päivänä, joista ensimmäinen oli totutuspäivä. Neljän seuraavan päivän aikana suoritettiin yhteensä kahdeksan ehdollistamissessiota, ja viimeisenä päivänä ehdollistamistesti. Kokeen vaiheet on esitetty kuvassa 1. Tunnistamisen helpottamiseksi hiirille tehtiin häntämerkit kuten ruokahalun säätelyn kokeissa. Ennen kokeiden aloitusta hiiret punnittiin

injektioannosten laskemista varten. Hiirten liikkeiden seuraamiseen ja analysoimiseen käytettiin Ethovision-ohjelmistoa. Ennen ensimmäisiä kokeita laatikoiden rajat piirrettiin tietokoneelle ja tietokoneohjelmalla suoritettavan hiiren havainnoinnin toimivuus testattiin varsinaisten hiirten kanssa samanvärisellä testihirellä. Koehuoneen valot säädettiin kokeiden ajaksi noin 50 luxiin. Kaikki kokeet suoritettiin hiirten valorytmin pimeävaiheen aikana.

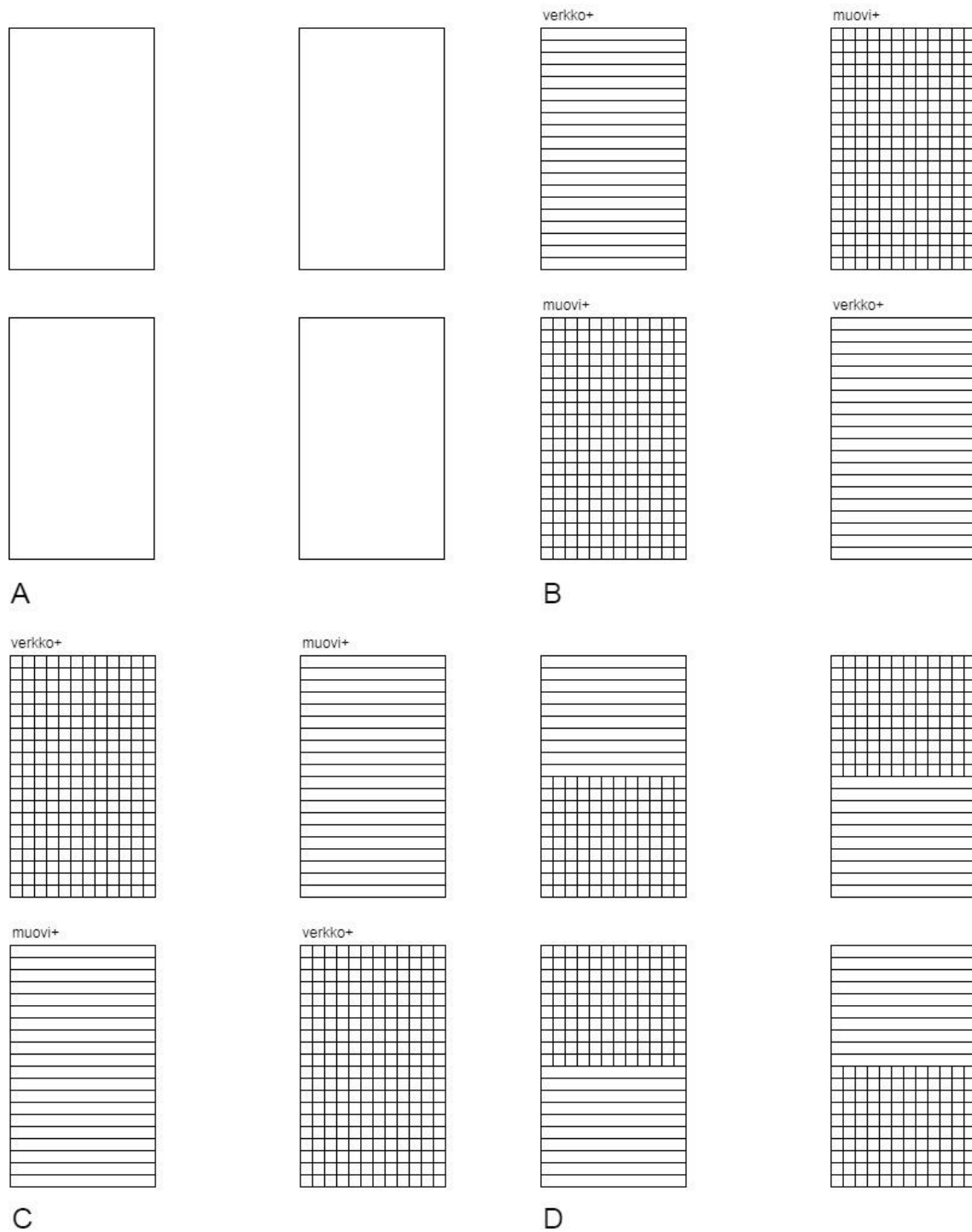


Kuva 1. Huumemuistikokeen vaiheet.

Totutuspäivänä hiirille annettiin salinia 0,1 ml/10 g i. p. ja laitettiin ne tyhjiin laatikoihin 30 minuutiksi. Hiiret vietiin koehuoneeseen noin tunti ennen kokeiden alkamista. Tunnin aikana suoritettiin hiirten punnitus ja laitettiin ensimmäisen hiiriryhmän ruiskut valmiiksi. Injektiot annettiin juuri ennen mittausession alkamista. Seuraavan ryhmän ruiskut laitettiin valmiiksi aina edellisen ryhmän ollessa mitattavana. Koesessioissa käytetyt laatikot ja lattiamateriaalit vaihdettiin ja pestiin vedellä jokaisen hiiren jälkeen.

Neljän päivän ehdollistamissessioissa jokainen hiiri laitettiin laatikkoon 30 minuutiksi kaksi kertaa päivässä. Hiiret vietiin koehuoneeseen vähintään puoli tuntia ennen kokeita. Ennen koehuoneeseen viemistä hiirille annettiin CNO:a (0,1 mg/ml; 0,1 ml/10 g) vatsaontelonsisäisesti. CNO-liuos valmistettiin saliinista, DMSO:sta ja CNO:sta samalla tavalla kuin ruokahalun säätelyn kokeissa. Juuri ennen laatikkoon laittamista hiirille annettiin i. p. injektiona joko salinia tai morfiinia 0,1 ml/10 g. Laatikossa oli joko muovilattia tai verkkolattia riippuen annettavasta injektioista. Morfiinin pitkän vaikutusajan vuoksi salini-injektiot annettiin aamupäivällä ja morfiini-injektiot iltapäivällä. Ruiskujen valmistelu ja välineiden pesu suoritettiin kuten totutuspäivänä.

Viimeisenä koepäivänä tehtiin ehdollistamistesti, jossa selvitettiin, oliko ehdollistumista tapahtunut. Hiiret laitettiin 30 minuutiksi laatikoihin, joissa puolet lattiasta oli muovia ja puolet verkkomateriaalia. Hiirille ei annettu injektioita. Ethovisionin avulla nähtiin, suosivatko hiiret jompaakumpaa materiaaleista. Esimerkki yhden hiiriryhmän läpikäymistä koevaiheista on esitetty kuvassa 2.



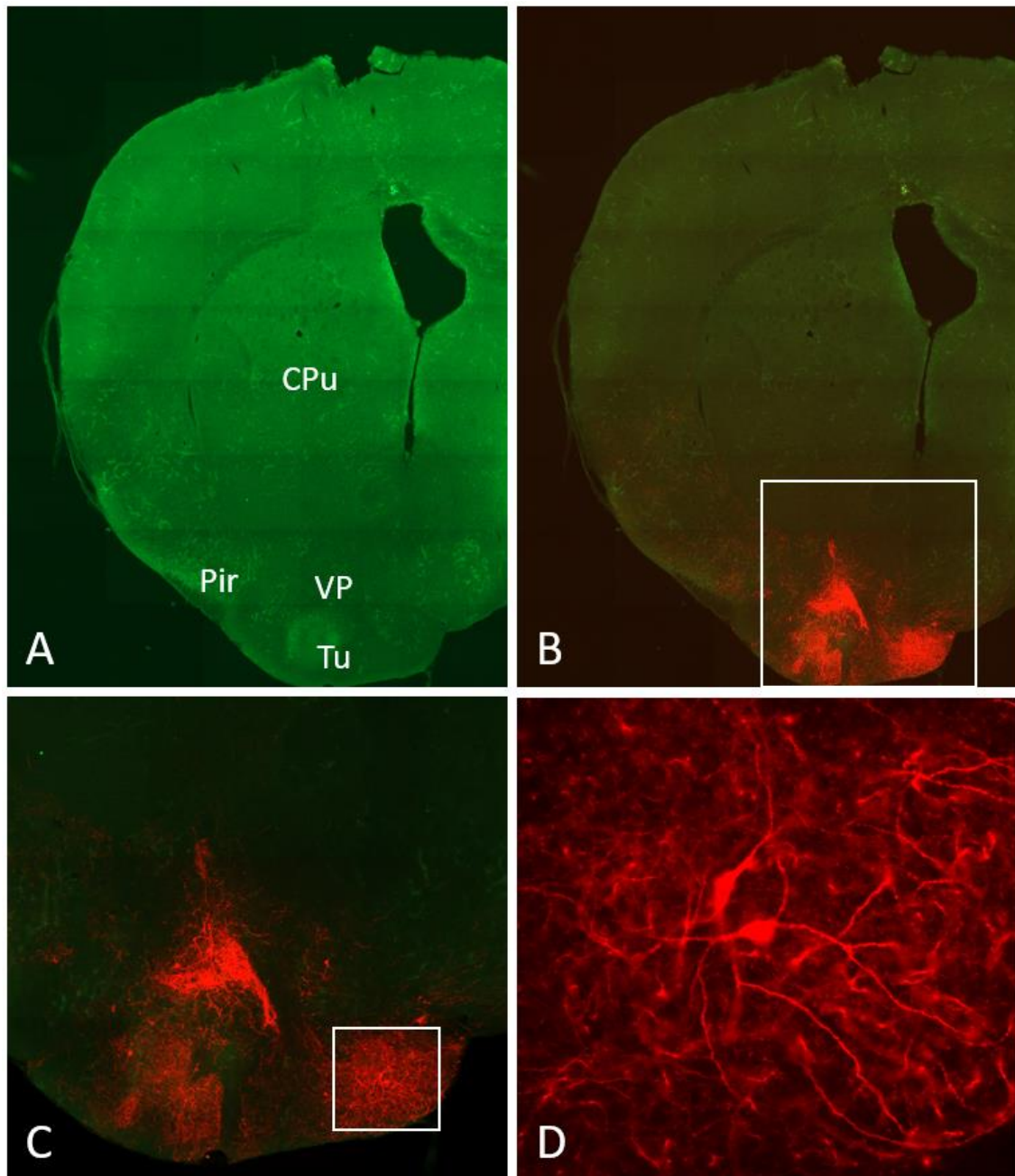
Kuva 2. Esimerkki yhden hiiriryhmän läpikäymistä koevaiheista. Suorakaide symboloi laatikkoa ja ruutu- tai raitakuvio laatikon lattiamateriaalia. Totutusvaiheessa (A) laatikot olivat tyhjiä. Aamupäivän (B) ja iltapäivän (C) ehdollistamissessioissa laatikoiden pohjalla oli joko muovilattia (raitakuvio) tai verkkolattia (ruutukuvio) riippuen laatikkoon laitettavan hiiren alaryhmästä (verkko+/muovi+). Ehdollistamistestissä (D) puolet laatikoiden pohjista oli muovimateriaalia ja puolet verkkomateriaalia. Vaiheet B ja C

toistettiin kullekin hiiriryhmälle samanlaisina yhteensä neljä kertaa (Päivät 2-5 kuvassa 1). Vaiheet A ja D tehtiin jokaiselle hiiriryhmälle vain kerran (Päivät 1 ja 6 kuvassa 1).

3.2.4 Aivojen tutkiminen

Ruokahalun säätelyn kokeiden ja huumemuistikokeen jälkeen kokeissa käytettyjen hiirten aivot perfusoiitiin ja poistettiin. Aivoja säilytettiin paraformaldehydiliuoksessa 12 tuntia ja 30-prosenttisessa sukroosiliuoksessa kaksi päivää, jonka jälkeen ne leikattiin Leica CM3050S -kryostaatilla (Leica, Nussloch, Saksa) 40 µm:n paksuisiksi leikkeiksi. Jäätymisenestoliuoksessa (sukroosi ja etyleeniglykoli) olevat leikkeet siirrettiin pakastimeen -20 °C:n lämpötilaan, jossa niitä säilytettiin värjäykseen asti. Värjäyksessä leikkeet pestiin 3 x 5 minuuttia fosfaattipuskuroidussa saliinissa (PBS), blokattiin normaaliseerumissa (donkey normal serum) ja inkuboitiin yön yli ensimmäisessä vasta-aineessa. Leikkeet pestiin PBS:ssä, inkuboitiin 2 tuntia toisessa vasta-aineessa ja pestiin. Värjäyksen avulla DREADD-reseptorit saatiin näkyviin mikroskopointia varten.

Värjätyt aivoleikkeet siirrettiin mikroskooppilaseille. Laseilla olevat aivoleikkeet tutkittiin Axioimager Z1 -mikroskoopilla (Zeiss, Saksa), ja kunkin hiiren aivoleikkeissä näkyvä lokalisaatio merkittiin ylös hiirten aivoatlaksesta (45) otettuun kuvaan. Mikroskopoinnin perusteella kahden hiiren aivoissa näkyvä lokalisaatio oli epäselvä eli DREADD-reseptoreja ei näiden hiirten OT:ssa ollut. Näiden hiirten tulokset jätettiin pois tuloksia analysoitaessa. Kuvassa 3 nähdään olfactory tuberclen neuronien lokalisaatio.



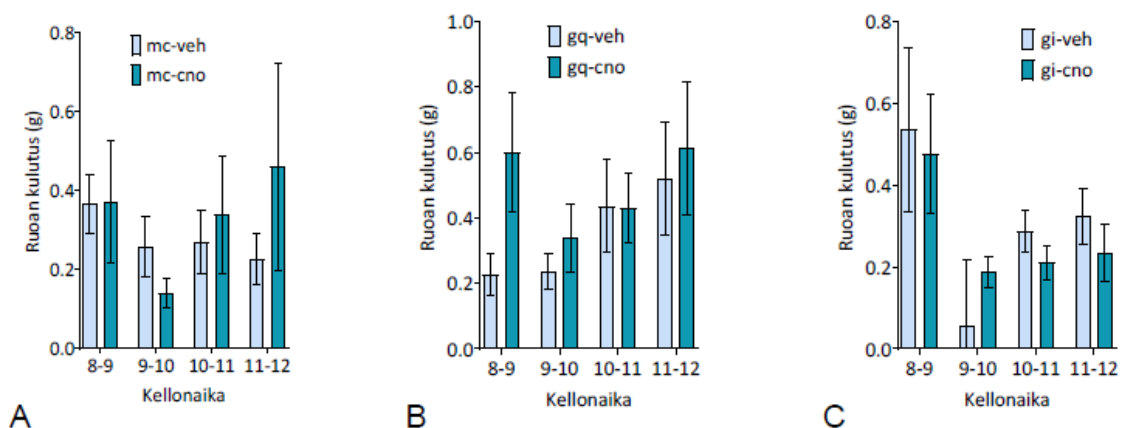
Kuva 3. Mikroskooppikuvat. Kuvaan A on merkitty striatumin (CPu), olfactory tubercle (Tu), piriformisen aivokuoren (Pi) ja ventral pallidumin (VP) sijainnit (45). Kuvassa B nähdään DREADD-reseptorien ilmentyminen OT:ssa. Kuvassa C näkyy suurennettuna kuvassa B näkyvä rajattu alue, ja kuvassa D vastaavasti suurennos kuvasta C.

4 Tulokset

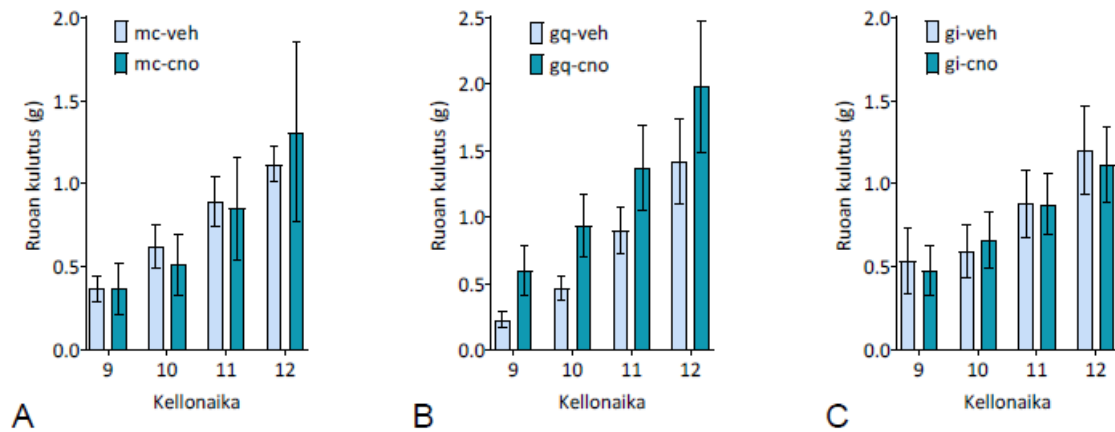
4.1 Ruokahalun säätelyn kokeet

4.1.1 Ilman paastojaksoa tehdyt kokeet

Kuvassa 4 nähdään kontrolliryhmän (A) sekä hermosoluja aktivoivien (B) ja inhiboivien (C) DREADD-reseptoriryhmien ruoan kulutus grammoina mittausajankohdan mukaan. Kussakin kuvassa näkyy hiirten ruoan kulutus sekä vehikkeliä (mc-/gq-/gi-veh) että cno:a (mc-/gq-/gi-cno) annettaessa. Ruoan kulutuksessa ei ole merkitsevää vaihtelua hiiriryhmien ($F_{2,30}=1.70$, $p=0.20$) eikä saliinia ja cno:a saaneiden hiirien välillä ($F_{1,30}=1.29$, $p=0.27$). Eri kellonaikoina kulutetuissa ruokamäärissä oli merkitseviä eroja ($F_{3,90}=3.54$, $p=0.02$), eli hiiret söivät enemmän ensimmäisen tunnin aikana kuin muiden tuntien aikana. Kuvassa 5 ruoan kulutus on esitetty kertymänä. Ruoan kulutuksessa ei ole merkitsevää vaihtelua hiiriryhmien ($F_{2,30}=1.07$, $p=0.35$) eikä saliinia ja cno:a saaneiden hiirien välillä ($F_{1,30}=2.17$, $p=0.15$). Hiiriryhmän, lääkkeen ja aikapisteiden välillä ei ollut merkitseviä yhteisvaikutuksia (tuloksia ei esitetty). Tulokset on esitetty keskiarvoina ja niiden keskivirheinä, $n = 5-7$.



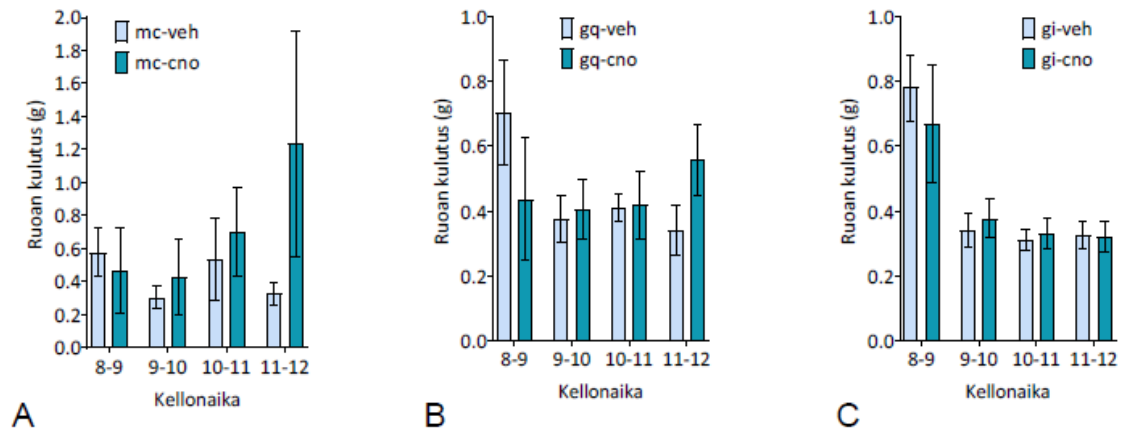
Kuva 4. Kontrollihiiriryhmän (A), gq-hiiriryhmän (B) ja gi-hiiriryhmän (C) ruoan kulutus grammoina kellonajan mukaan.



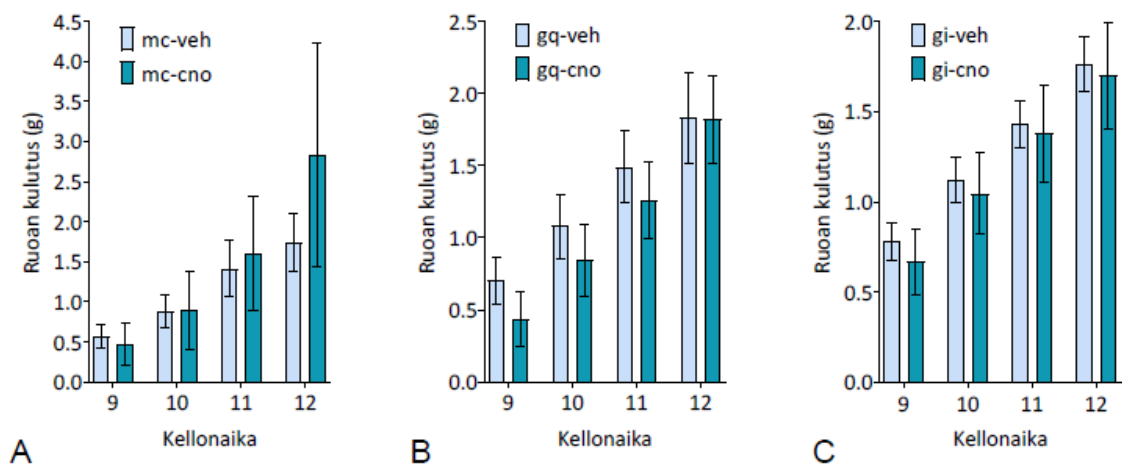
Kuva 5. Kontrollihiiriryhmän (A), gq-hiiriryhmän (B) ja gi-hiiriryhmän (C) ruoan kulutuksen kertymä grammoina kellonajan mukaan.

4.1.2 Paastojakson jälkeen tehdyt kokeet

Kuvassa 6 nähdään kontrolliryhmän (A) sekä hermosoluja aktivoivien (B) ja inhiboivien (C) DREADD-reseptoriryhmien ruoan kulutus grammoina eri mittausajankohtina. Mittaukset toteutettiin paastojakson jälkeen. Paaston vaikutus ilmenee suurempana ruoan kokonaiskulutuksena kaikissa hiiriryhmissä (paastovaikutus, $F_{1.60}=6.00$, $p=0.02$). Ruoan kulutuksessa ei ole merkitsevää vaihtelua hiiriryhmien ($F_{2.30}=0.42$, $p=0.66$) eikä saliniin ja cno:a saaneiden hiirien välillä ($F_{1.30}=0.37$, $p=0.55$). Eri kellonaikoina kulutetuissa ruokamäärissä oli merkitseviä eroja ($F_{3.90}=2.82$, $p=0.04$), eli hiiret söivät enemmän ensimmäisen tunnin aikana kuin muiden tuntien aikana. CNO:n anto lisäsi ruoankulutusta ensimmäisen tunnin aikana ($F_{3.90}=3.46$, $p=0.02$). Kuvassa 7 ruoan kulutus on esitetty kertymänä. Ruoan kulutuksessa ei ole merkitsevää vaihtelua hiiriryhmien ($F_{2.30}=0.05$, $p=0.95$) eikä saliniin ja cno:a saaneiden hiirien välillä ($F_{1.30}=0.01$, $p=0.99$). Muita merkitseviä yhteisvaikutuksia ei löytynyt (tuloksia ei esitetty). Tulokset on esitetty keskiarvoina ja niiden keskivirheinä, $n = 5-7$.



Kuva 6. Kontrollihiiriryhmän (A), gq-hiiriryhmän (B) ja gi-hiiriryhmän (C) paastojakson jälkeinen ruoan kulutus grammoina kellonajan mukaan.

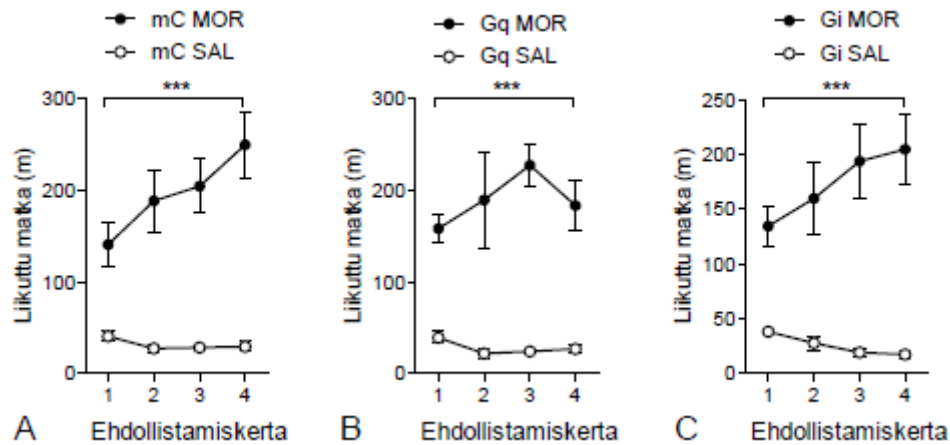


Kuva 7. Kontrollihiiriryhmän (A), gq-hiiriryhmän (B) ja gi-hiiriryhmän (C) paastojakson jälkeisen ruoan kulutuksen kertymä grammoina kellonajan mukaan.

4.2 Huumemuistikoe

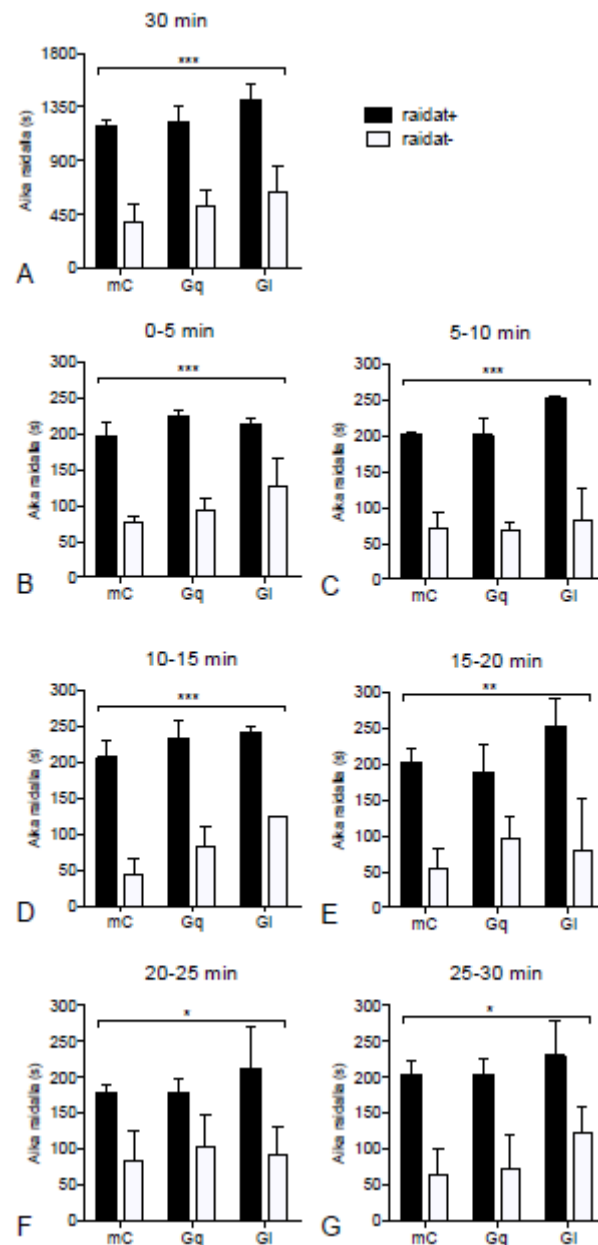
Olfactory tuberclessa sijaitsevat kolinergiset hermosolut eivät vaikuta morfiinin liikeaktiivisuuteen eivätkä morfiinille herkistymiseen. Kuvassa 8 nähdään kontrolliryhmän (A) sekä hermosoluja aktivoivien (B) ja inhiboivien (C) DREADD-reseptoriryhmien liikkuma matka eri ehdollistamiskerroilla. Morfiini lisää merkittävästi hiirten liikeaktiivisuutta kaikissa ryhmissä. Hermosolujen aktivaatio tai inhibitio

DREADD-reseptorivälitteisesti ei vaikuta morfiinin vasteeseen. Tulokset on esitetty keskiarvoina ja niiden keskivirheinä, $n = 5-7$.



Kuva 8. Kontrollihiiriryhmän (A), gq-hiiriryhmän (B) ja gi-hiiriryhmän liikkuma matka ehdollistamiskerran ja annetun injektion (MOR/SAL) mukaan.

Morfiini aiheutti ehdollistetun paikkahakuisuuden kehittymisen hiirille, kuva 9A (ANOVA, ehdollistumisryhmävaikutus (raidat+ vs raidat-), $F_{1,11}=37.02$, $p<0.001$). Hermosolujen aktivaatio tai inhibitio DREADD-reseptorivälitteisesti ei vaikuta morfiinin aikaansaamaan ehdollistumiseen (ANOVA, DREADD-reseptorivaikutus, $F_{2,11}=1.03$, $p=0.39$; DREADD-reseptorivaikutuksen ja ehdollistamisryhmävaikutuksen yhteisvaikutus, $F_{2,11}=0.05$, $p=0.95$). Tulokset analysoitiin myös jakaen 30 minuutin paikkahakuisuustesti viiden minuutin mittaisiin aikajaksoihin, kuva 9B-G. Morfiinin paikkahakuisuus oli samalla tasolla koko 30 minuutin testin ajan (ANOVA, aikajaksovaikutuksen ja ehdollistamisryhmävaikutuksen yhteisvaikutus, $F_{5,55}=0.93$, $p=0.47$).



Kuva 9. Mc-, gi- ja gq-hiiriryhmien raidallisella muovialustalla viettämä aika raidallisella alustalla annetun injektion mukaan jaoteltuna. Kuvassa nähdään eri hiiriryhmien raidallisella alustalla viettämä aika kokonaisajan ollessa 1800 sekuntia. Hiiret on jaettu DREADD-reseptorin mukaisiin ryhmiin mC, Gq ja Gi, ja nämä ryhmät edelleen raidallisella alustalla morfiinia saaneisiin (raidat+) ja raidallisella alustalla saliinia saaneisiin (raidat-) ryhmiin. Tulokset on esitetty keskiarvoina ja niiden keskivirheinä, n = 5-7.

5 Pohdinta

Tulosten perusteella olfactory tuberclessa sijaitsevat kolinergiset välineuronit eivät vaikuta morfiinin aikaansaamaan palkkioon tai ehdollistumiseen. Tulosten mukaan OT:n kolinergiset välineuronit eivät osallistu myöskään ruokahalun säätelyyn. Tämä voi tarkoittaa, että ruokahalua tai huume-ehdollistumista säätelevät neuronit sijaitsevat kokonaan muualla kuin OT:ssa. Vaihtoehtoisesti OT:ssa voi olla ruokahalua tai huume-ehdollistumista sääteleviä neuroneita, jotka kuuluvat johonkin muuhun kuin kolinergiseen järjestelmään. Tutkielmassa käytetty aineisto on kuitenkin melko pieni, joten tulokset ovat vain suuntaa antavia.

Olfactory tuberclen kolinergistä järjestelmää tai osuutta ruokahalun säätelyssä ja huume-ehdollistumisessa on tutkittu hyvin vähän. Asetyylikoliinin tiedetään moduloivan OT:n monimuotoisen solukerroksen synapseja. Molekulaarikerroksen synapseja se ei moduloi. (9) OT:n neuronien on havaittu koodaavan ruokahalun ohjaamaa tavoitteellista toimintaa (appetively driven instrumental behavior). Osa OT:n neuroneista koodittaa palkkiota sen voimakkuuden, osa palkkion tyyppin mukaan. Joidenkin neuroneiden on havaittu suosivan sakkariinia, mikä saattaa viitata maittavuuden olevan merkittävä tekijä OT:n koodittaessa palkkiota. (6)

Tutkielman reliabiliteettiin vaikuttaa erityisesti aineiston pieni koko. Suppeassa aineistossa pienikin virhe esimerkiksi mittaustulosten kirjaamisessa voi vaikuttaa tuloksiin huomattavasti. Ruokahalun säätelyn kokeissa reliabiliteettia saattoi vähentää erityisesti ruoankulutuksen mittaamiseen liittyvät tekijät. Ruoan punnitseminen suoritettiin hyvin hämärässä valaistuksessa, jolloin häkkiin tai punnitusastiaan saattoi epähuomiossa jäädä pala ruokaa. Ruokapaloja saattoi myös tippua häkin pohjalle ilman, että hiiri todellisuudessa söi niitä kokonaan. Myös mittaustulosten kirjaamisessa sekä injektioiden antamisessa on voinut tapahtua virheitä niin ruokahalun säätelyn kuin huumemuistikokeen eri vaiheissa. Injektioannos mitattiin silmämääräisesti, joten mittaajan havaintotarkkuudella oli vaikutusta annokseen.

Tutkittaessa hiirten aivoja havaittiin, että osalla hiiristä reseptorien ilmentyminen olfactory tubercllessa oli epäselvä. Osalla hiiristä reseptorit ilmentyivät OT:n ulkopuolella mutta eivät OT:n alueella, ja osalla reseptorit eivät ilmentyneet lainkaan tai ilmentyminen näkyi vain toisella aivopuoliskolla. Kaksi hiirtä jouduttiin puutteellisen ilmentymisen poistamaan kokonaan analysoitavasta aineistosta, mikä pienensi aineiston kokoa. Myös yhden hiiren kuolema kesken kokeiden pienensi aineiston kokoa ja siten vähensi tulosten luotettavuutta.

Tutkimuksen tarkoituksena oli mitata olfactory tuberclen merkitystä ruokahalun säätelyssä ja huume-ehdollistumisessa. Käytetyt mittausmenetelmät soveltuivat hyvin näiden ilmiöiden mittaamiseen, eli tutkimuksen validiteetti voidaan arvioida hyväksi.

Tutkielman kliininen merkitys on vähäinen, sillä OT:n asetyylikoliinijärjestelmän merkitys ruokahalun säätelyssä ja huume-ehdollistumisessa jäi tutkielman perusteella vielä epäselväksi. Tutkielma kuitenkin kannustaa tutkimaan aihetta lisää. Jatkotutkimukset aiheesta voisivat tuottaa kliinisesti merkittävää tietoa ruokahalun säätelyn sekä huumeiden käyttöön liittyvän palkitsevuuden mekanismeista. Ruokahalun säätelymekanismien tunteminen auttaa ymmärtämään ylipainon taustaa ja siten kehittämään parempia keinoja sen ehkäisemiseksi ja hoitamiseksi. Huumeiden palkitsevuuteen liittyvien järjestelmien selvittäminen puolestaan edistää psykiatristen häiriöiden mekanismien ymmärtämistä ja hoidon kehittämistä.

Aihetta voisi tutkia lisää käyttäen erilaisia menetelmiä. Olfactory tuberclen kolinergistä järjestelmää voisi tutkia esimerkiksi poistamalla geeniteknologian avulla OT:stä kolinergisiä soluja. Solujen poistamisella saattaisi olla suurempi vaikutus kolinergisen järjestelmän toimintaan kuin tässä tutkimuksessa käytetyllä solujen hiljentämisellä. Ruokahalun säätelyn kokeiden reliabiliteettia voisi parantaa käyttämällä manuaalisen punnituksen sijaan laitetta, joka annostelee ja punnitsee hiirien syömän ruoan automaattisesti.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että tämän tutkielman tulosten perusteella olfactory tuberclen kolinergiset neuronit eivät osallistu ruokahalun säätelyyn tai huumeiden käyttöön, mutta tulosten vahvistamiseksi aihetta on tutkittava lisää.

Lähdeluettelo

- (1) Volkow ND, Wang GJ, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci* 2011 Jan;15(1):37-46.
- (2) Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM, Ferguson SM. The ins and outs of the striatum: role in drug addiction. *Neuroscience* 2015 Aug 20;301:529-541.
- (3) Kelley AE. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev* 2004 Jan;27(8):765-776.
- (4) Aitta-Aho T, Phillips BU, Pappa E, Hay YA, Harnischfeger F, Heath CJ, et al. Accumbal Cholinergic Interneurons Differentially Influence Motivation Related to Satiety Signaling. *eNeuro* 2017 May 9;4(2):10.1523/ENEURO.0328-16.2017. eCollection 2017 Mar-Apr.
- (5) Avena NM, Rada PV. Cholinergic modulation of food and drug satiety and withdrawal. *Physiol Behav* 2012 Jun 6;106(3):332-336.
- (6) Gadziola MA, Wesson DW. The Neural Representation of Goal-Directed Actions and Outcomes in the Ventral Striatum's Olfactory Tubercle. *J Neurosci* 2016 Jan 13;36(2):548-560.
- (7) Striano BM, Barker DJ, Pawlak AP, Root DH, Fabbricatore AT, Coffey KR, et al. Olfactory tubercle neurons exhibit slow-phasic firing patterns during cocaine self-administration. *Synapse* 2014 Jul;68(7):321-323.
- (8) Xiong A, Wesson DW. Illustrated Review of the Ventral Striatum's Olfactory Tubercle. *Chem Senses* 2016 Sep;41(7):549-555.
- (9) Wesson DW, Wilson DA. Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: hedonics, sensory integration, and more? *Neurosci Biobehav Rev* 2011 Jan;35(3):655-668.
- (10) Giessel AJ, Datta SR. Olfactory maps, circuits and computations. *Curr Opin Neurobiol* 2014 Feb;24(1):120-132.
- (11) Yamaguchi M. Functional Sub-Circuits of the Olfactory System Viewed from the Olfactory Bulb and the Olfactory Tubercle. *Front Neuroanat* 2017 Apr 11;11:33.
- (12) Murata K, Kanno M, Ieki N, Mori K, Yamaguchi M. Mapping of Learned Odor-Induced Motivated Behaviors in the Mouse Olfactory Tubercle. *J Neurosci* 2015 Jul 22;35(29):10581-10599.
- (13) Gadziola MA, Tylicki KA, Christian DL, Wesson DW. The olfactory tubercle encodes odor valence in behaving mice. *J Neurosci* 2015 Mar 18;35(11):4515-4527.
- (14) Ikemoto S. Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. *J Neurosci* 2003 Oct 15;23(28):9305-9311.
- (15) Wesson DW, Wilson DA. Smelling sounds: olfactory-auditory sensory convergence in the olfactory tubercle. *J Neurosci* 2010 Feb 24;30(8):3013-3021.

- (16) Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 2007 Nov;56(1):27-78.
- (17) Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 2012 Oct 4;76(1):116-129.
- (18) Tucek S. Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J Neurochem* 1985 Jan;44(1):11-24.
- (19) Mesulam MM. Cholinergic pathways and the ascending reticular activating system of the human brain. *Ann N Y Acad Sci* 1995 May 10;757:169-179.
- (20) Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:403-443.
- (21) Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009 Jan;89(1):73-120.
- (22) Dani JA. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol* 2015;124:3-19.
- (23) Haga T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2013;89(6):226-256.
- (24) Eglen RM. Overview of muscarinic receptor subtypes. *Handb Exp Pharmacol* 2012;(208):3-28. doi(208):3-28.
- (25) Ikemoto S, Bonci A. Neurocircuitry of drug reward. *Neuropharmacology* 2014 Jan;76 Pt B:329-341.
- (26) Alonso-Alonso M, Woods SC, Pelchat M, Grigson PS, Stice E, Farooqi S, et al. Food reward system: current perspectives and future research needs. *Nutr Rev* 2015 May;73(5):296-307.
- (27) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Baler R. Food and drug reward: overlapping circuits in human obesity and addiction. *Curr Top Behav Neurosci* 2012;11:1-24.
- (28) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D. Addiction circuitry in the human brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:321-336.
- (29) Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord* 2013 Dec;14(4):387-407.
- (30) Tremblay A, Bellisle F. Nutrients, satiety, and control of energy intake. *Appl Physiol Nutr Metab* 2015 Oct;40(10):971-979.
- (31) Bellisle F, Drewnowski A, Anderson GH, Westerterp-Plantenga M, Martin CK. Sweetness, satiation, and satiety. *J Nutr* 2012 Jun;142(6):1149S-54S.
- (32) Berthoud HR. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 2011 Dec;21(6):888-896.

- (33) DiLeone RJ, Taylor JR, Picciotto MR. The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nat Neurosci* 2012 Oct;15(10):1330-1335.
- (34) Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci* 2011 Oct 20;12(11):638-651.
- (35) Rogers PJ, Hardman CA. Food reward. What it is and how to measure it. *Appetite* 2015 Jul;90:1-15.
- (36) Volkow ND, Morales M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 2015 Aug 13;162(4):712-725.
- (37) Naim-Feil J, Zangen A. Addiction. *Handb Clin Neurol* 2013;116:613-630.
- (38) Ferguson SM, Neumaier JF. Using DREADDs to investigate addiction behaviors. *Curr Opin Behav Sci* 2015 Apr;2:69-72.
- (39) Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD. Obesity and addiction: neurobiological overlaps. *Obes Rev* 2013 Jan;14(1):2-18.
- (40) Urban DJ, Roth BL. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:399-417.
- (41) Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 2016 Feb 17;89(4):683-694.
- (42) Lee HM, Giguere PM, Roth BL. DREADDs: novel tools for drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2014 Apr;19(4):469-473.
- (43) Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 2006 Mar;11(1):2-38.
- (44) Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ. Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 1995 Spring;19(1):39-51.
- (45) Paxinos G, Franklin KBJ. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed.: Academic Press; 2012.